



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 199 40 415 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**A 23 L 1/30**

②1 Aktenzeichen: 199 40 415.1  
②2 Anmeldetag: 26. 8. 1999  
④3 Offenlegungstag: 8. 3. 2001

⑦1 Anmelder:  
Spener, Friedrich, Prof. Dr., 48149 Münster, DE

⑦2 Erfinder:  
Spener, Friedrich, Prof. Dr., 48147 Münster, DE;  
Wolfrum, Christian, Dipl.-Chem., 48149 Münster, DE

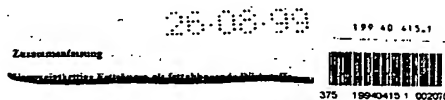
⑤6 Entgegenhaltungen:  
WO 99 20 722  
Chem. Abstr. 130, 265265z (1999);  
Chem. Abstr. 128, 304760m (1998);  
Römpf, Lexikon chemie, 10.Aufl., 1999, Georg  
Thieme Verlag, Stuttgart, Bd.4, S.3332;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

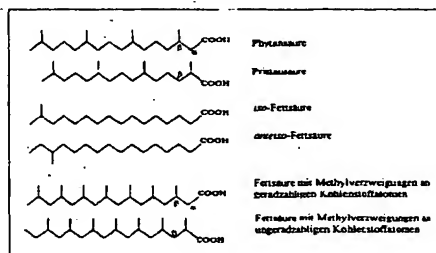
Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verzweigt-kettige Fettsäuren als fettabbauende Wirkstoffe

⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft verzweigt-kettige Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem der Peroxisomen Proliferator aktivierter Rezeptoren (PPAR) Isoformen oder strukturverwandter, ligandaktivierter Kernrezeptoren und/oder mit einem Lipidbindungsprotein vom Strukturtyp der 14-15 kDa Fettsäurebindungsproteine, direkt wechselwirken, als Wirkstoffe mit einem fettdepotreduzierenden Effekt. Zu diesen verzweigt-kettigen Fettsäuren gehören die als Beispiele aufgeführten verzweigt-kettigen Fettsäuren vom Isoprenoid- und Acetogenintyp. Weiterhin betrifft diese Erfindung den Einsatz dieser verzweigt-kettigen Fettsäuren als Zusatzstoffe zu Diätetika, Nahrungsmitteln und Genußmitteln zur Vermeidung von Übergewicht und zur Reduktion bestehender Fettdepots.



2 Die vorliegende Erfindung betrifft verzweigt-kettige Fettsäuren, die mit einem der Peroxisomen Proliferator aktivierten Rezeptor (PPAR) Isoformen oder strukturverwandter, ligandaktiver Kernrezeptoren und/oder mit einem Lipidbindungsprotein vom Strukturtyp der 14-15 kDa Fettsäurebindungsproteine, direkt wechselwirken, als Wirkstoffe mit einem fettdepotreduzierenden Effekt. Zu diesen verzweigt-kettigen Fettsäuren gehören die als Beispiele aufgeführten verzweigt-kettigen Fettsäuren vom Isoprenoid- und Acetogenintyp. Weiterhin betrifft diese Erfindung den Einsatz dieser verzweigt-kettigen Fettsäuren als Zusatzstoffe zu Diätetika, Nahrungsmitteln und Genußmitteln zur Vermeidung von Übergewicht und zur Reduktion bestehender Fettdepots.



DE 199 40 415 A 1

BEST AVAILABLE COPY

Die vorliegende Erfindung betrifft natürliche Fettsäuren des Isoprenoid- und Acetogenintyps mit Methyl- und Ethylverzweigung und synthetische verzweigtkettige Fettsäuren als Diätetika und Zusatzstoffe zu Nahrungs- und Genußmitteln zur Förderung des Fettabbaus bei Menschen.

Der Anspruch erstreckt sich auf natürliche und synthetische verzweigtkettige Fettsäuren, deren Struktur angepaßt ist für die Bindung dieser Fettsäuren durch Isoformen des Peroxisomen Proliferator aktivierten Rezeptors (PPAR) sowie durch Lipidbindungsproteine vom Strukturtyp der 14–15 kDa Fettsäurebindungsproteine.

Die Lipidhomöostase in Menschen und in Säugetieren wird durch die Balance zwischen Energiezufuhr (Nahrungsaufnahme) und -verbrauch reguliert. Aus diesem Grund existieren Kontrollmechanismen in Bezug auf die Verfügbarkeit von Kohlenhydraten und Fetten, ihren Transport, Stoffwechsel, Einbau und Mobilisation. Übersteigt die Energiezufuhr den Energieverbrauch so wird dieses Gleichgewicht gestört und bedingt Gewichtszunahme, deren größter Anteil auf die Bildung von Fettdepots zurückzuführen ist (Woods et al. (1998) Science 280, 1378–1383).

Unter die Isoformen ligandaktivierter Kernrezeptoren des PPAR Typs fallen die bis heute bekannten PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  (auch NucI oder FAAR) und PPAR $\gamma$ 1-2 (Wahli et al. (1999) Adv. Exp. Med Biol. 447, 199–209). Der katabole Fettstoffwechsel unterliegt der Kontrolle der PPARs, die als Zielmoleküle für hypolipidämische Medikamente fungieren und über die Steuerung mehrerer Schlüsselenzyme des peroxisomalen und mitochondrialen Stoffwechsels sowie der Lipoproteinlipase und verschiedener Apolipoproteine den katabolen Fettsäurestoffwechsel in Eukaryoten transkriptionell regulieren (Hashimoto et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 19228–19236). Die hypolipidämischen Medikamente werden unter dem Begriffe der peroxisomalen Proliferatoren zusammengefaßt; der Name dieser Stoffe leitet sich aus der Fähigkeit ab, ausschließlich in Nagern die peroxisomale Proliferation, d. h. Größe und Menge der Peroxisomen, zu induzieren. Bezogen auf den Menschen führt die Aktivierung dieser Rezeptoren zu einer gesteigerten Expression der lipidabbauenden Enzyme, die sich zum Beispiel in einer Verringerung der Triacylglycerinkonzentration im Blut auswirkt und das Risiko einer Fettleibigkeit damit verbundenen Typ II Diabetes verringert. In jüngerer Zeit wurden geradkettige Fettsäuren als natürliche Agonisten der PPARs identifiziert (Bocos et al. (1995) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 53, 467–473).

Unter den Begriff Lipidbindungsproteine vom Strukturtyp der 14–15 kDa Fettsäurebindungsproteine (FABPs) fallen die bis heute bekannten 19 Mitglieder dieser Familie, die ein Strukturmotiv bestehend aus zwei orthogonalen  $\beta$ -Faltblättern sowie zwei  $\alpha$ -Helices aufweisen (Hohoff und Spener (1998) Fett/Lipid 100, 252–263). Diese Proteine binden geradkettige Fettsäuren, manche Vertreter binden jedoch auch die hypolipidämischen Medikamente. Den erstmals 1972 beschriebenen Proteinen (Ockner et al. (1972) Science 177, 56–58) wird eine Rolle im intrazellulären Fettsäuretransport und Fettstoffwechsel einerseits und in der Regulation von Genen des Fettstoffwechsels andererseits zugeschrieben (Glatz et al. (1995) Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 52, 121–127). Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß die Lipidhomöostase durch die PPAR-vermittelte Genregulation durch Interaktion des Rezeptors und Lipidbindungsprotein sowie durch Interaktion beider Proteine mit geradkettigen Fettsäuren beeinflusst werden kann.

Erstmals konnten wir nun zeigen, daß die Lipidhomöostase auf die verzweigtkettige Phytansäure äußerst empfind-

lich reagiert (Ellinghaus et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 2766–2772). Dabei fungieren die Fettsäurebindungsproteine als cytosolische Diskriminator- und Transportproteine für die PPAR-Agonisten in den Kern, die dort über PPAR-Transaktivierung die Genexpression der Enzyme des katabolen Fettstoffwechsels steuern. Die Erfindung erstreckt sich auf verzweigtkettige Fettsäuren, die über diesen Mechanismus die ligandaktivierten Kernrezeptoren besser transaktivieren als gesättigte und ungesättigte geradkettige Fettsäuren und daher einen verstärkten Abbau der Fettdepots bewirken. In pathologisch hohen Konzentrationen von Phytansäure in Sera und Lebern, wie in sterol carrier protein 2 defizienten Mäusen gezeigt, kommt es sogar zu einem Totalabbau der Fettdepots (Seedorf et al. (1998) Genes Dev. 12, 1189–1201). Bei Patienten mit bestimmten genetischen Stoffwechseldefekten, wie z. B. dem Refsum-Syndrom, kann der Spiegel der Phytansäure bei 1,3 mM liegen und langfristig neurologische Schäden bedingen (Kahlke et al. (1964) Klin. Wochenschr. 42, 1011–1018). Die verzweigtkettigen Fettsäuren sind jedoch als Minorinkomponenten Bestandteil der menschlichen Nahrung, beispielsweise beträgt der Phytansäurespiegel im Serum Gesunder zwischen 0,5 und 10  $\mu$ M.

Zu den natürlich vorkommenden, verzweigtkettigen Fettsäuren gehören Isoprenoidfettsäuren, wie die Phytansäure und Pristansäure, Acetogenin-abgeleitete Fettsäuren wie iso- und anteiso-Fettsäuren und die von der Uropygialdrüse der Vögel sezernierten Fettsäuren (Jacob und Ziswiler (1982) Avian Biology 6, 199–314), einschließlich der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Oxidationsprodukte aller verzweigtkettigen Fettsäuren soweit sie von den Kernrezeptoren und Lipidbindungsproteinen gebunden werden. Verzweigtkettige Fettsäuren die von der Uropygialdrüse produziert werden, haben Methyl- und Ethylverzweigungen in variierender Anzahl an ungeradzahigen oder geradzahigen Kohlenstoffatomen der Fettsäurekette.

Beispiele für verzweigtkettige Fettsäuren, die für die Erfindung relevant sind, sind in Abb. 1 dargestellt.

Der Anspruch bezieht sich auf den Einsatz der verzweigtkettigen Fettsäuren in reiner Form, als Mischung mehrere verzweigtkettiger Fettsäuren und als Proform. Zu letzteren zählen metabolische Vorstufen, die im Organismus zum Wirkstoff umgewandelt werden, zum Beispiel Phytol zu Phytansäure, und in Estern gebundene verzweigtkettige Fettsäuren, aus denen der Wirkstoff im Organismus freigesetzt wird, zum Beispiel aus Triacylglycerinen.

Die Erfindung wird nun weiter mit Bezug auf die nachfolgenden Beispiele beschrieben.

#### Beispiel 1

Das Transaktivierungspotential der Fettsäuren und Medikamente für PPARs und damit für die Kapazität, fettabbauende Enzyme verstärkt zu induzieren, wird in Transaktivierungssassays deutlich. Immortalisierte humane Leberzellen (HepG2) wurden mit einem PPAR $\alpha$ -sensitiven CAT-Reportergen, einem Expressionsvektor für humanen PPAR $\alpha$  und einem  $\beta$ -Gal Normierungsvektor transient transfiziert und mit den in Abb. 2 bezeichneten Agonisten für 24 h inkubiert. Die CAT- und  $\beta$ -Gal-Konzentration wurde jeweils durch ELISAs bestimmt, das Verhältnis beider Werte spiegelt die PPAR $\alpha$ -Transaktivierung wider. Das Ergebnis zeigt, daß die verzweigtkettige Phytansäure und Pristansäure den humanen PPAR $\alpha$  etwa 2–4 mal stärker als die geradkettigen Fettsäuren transaktivieren. Im Vergleich zum potenten hypolipidämischen Medikament Bezafibrat liegt die Aktivierungskapazität der Pristansäure etwa doppelt so hoch (Abb. 2).

## Beispiel 2

Wir zeigen in Abb. 3, daß neben PPAR das Fettsäurebindungsprotein ebenfalls ein Zielmolekül für PPAR-Agonisten ist, da die Transaktivierung von der intrazellulären Konzentration an Fettsäurebindungsprotein, das die Agonisten ebenso bindet, abhängt. HepG2-Zellen, die stabil mit antisense Leber (L-)FABP transfiziert wurden, haben je nach Klon einen geringeren L-FABP Gehalt als normale HepG2-Zellen. Diese Zellklone wurden wie unter Beispiel 1 beschrieben transfiziert, mit verzweigt- und geradkettigen Fettsäuren für 24 h inkubiert und die CAT-,  $\beta$ -Gal- und L-FABP-Konzentration durch ELISAs bestimmt. Die beobachtete positive Korrelation von PPAR $\alpha$ -Aktivierung und intrazellulärer L-FABP-Konzentration beweist, daß L-FABP am Transport der Agonisten zum Kernrezeptor PPAR $\alpha$  beteiligt ist (Abb. 3), eine Extrapolation auf den Nullwert der L-FABP Konzentration ergibt, daß ohne L-FABP keine PPAR $\alpha$ -Aktivierung durch Agonisten möglich ist. Auch dieses Beispiel zeigt, daß verzweigte Fettsäuren das höhere Transaktivierungspotential als geradkettige Fettsäuren besitzen.

## Beispiel 3

In vivo Untersuchungen an der Maus weisen die Bedeutung der verzweigt-kettigen Fettsäuren für die Genexpression und die Gewichtsabnahme nach. Mäusen wurden mit Normalfutter, dem 0.5 Gew.-% Pristansäure zugesetzt wurde, für 2 Wochen ad libitum gefüttert und das Gewicht dieser Mäuse kontrolliert. Nach der Fütterung wurde die RNA aus der Leber isoliert und der Gehalt der mRNAs für die Enzyme des peroxisomalen katabolen Fettsäurestoffwechsels, der Acyl-CoA-Oxidase (ACO), des peroxisomalen bifunktionellen Enzyms (PBE) sowie der peroxisomalen Thiolase (pTHIOL) durch Northern-Blotting quantifiziert, normalisiert auf die stetige Expression der mRNA für Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH). Es zeigt sich eine 2-4fache Anstieg in der mRNA-Konzentration der untersuchten Enzyme (Abb. 4) in der Leber der mit Pristansäure-Zusatz gefütterten Mäuse. Zusätzlich zu dem Effekt auf die Enzyme war nach Fütterung dieser Fettsäure bei den Mäusen einen Gewichtsverlust von 2%, einhergehend mit einer teilweisen Reduktion des Fettgewebes zu beobachten. Dieser Versuch zeigt direkt am Organismus den Einfluß der verzweigt-kettigen Fettsäuren auf den katabolen Lipidstoffwechsel.

## Patentansprüche

1. Natürliche isoprenoid- und acetogeninabgeleitete Fettsäuren mit Methyl- oder Ethylverzweigung, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mit einem der PPAR Isoformen, und/oder mit einem Lipidbindungsprotein vom Strukturtyp der 14-15 kDa Fettsäurebindungsproteine, direkt wechselwirken.
2. Synthetische Fettsäuren mit Verzweigungsmustern, die natürlich nicht vorkommen, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem der PPAR Isoformen und/oder mit einem Lipidbindungsprotein vom Strukturtyp der 14-15 kDa Fettsäurebindungsproteine, direkt wechselwirken.
3. Verzweigt-kettige Fettsäuren gemäß Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Expression lipidabbauender Enzyme und die von Lipidbindungs- und -transportproteinen verstärken.
4. Proformen der verzweigt-kettigen Fettsäuren gemäß Ansprüche 1 und 2, wie die metabolischen Vorstufen

der verzweigt-kettigen Fettsäuren und wie die ester gebundenen verzweigt-kettige Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß sie nach Umwandlung in die Wirkstoffe die Expression lipidabbauender Enzyme und die von Lipidbindungs und -transportproteinen verstärken.

5. Verwendung der verzweigt-kettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 1 bis 4 als Diätetikum zur Reduktion der Fettdepots.

6. Verwendung der verzweigt-kettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 1 bis 4 als Diätetikum zur Vermeidung von Übergewicht.

7. Applikation der verzweigt-kettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 5 und 6 als Einzelkomponenten oder im Gemisch gelöst in Trägerölen oder in stabilen Emulsionen.

8. Applikation der verzweigt-kettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 5 und 6 als Einzelkomponenten oder im Gemisch in Kapseln, Dragees, Tabletten oder Pellets, oder als Zusatz zu festen oder flüssigen diätetischen Lebensmitteln.

9. Verwendung der verzweigt-kettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 1 bis 4 als Zusatzstoffe zur Reduktion der Fettdepots.

10. Verwendung der verzweigt-kettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 1 bis 4 als Zusatzstoffe zur Vermeidung von Übergewicht.

11. Applikation der verzweigt-kettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 9 und 10 als Einzelkomponenten oder im Gemisch als Zusatzstoffe in Fetten, Ölen oder Fettemulsionen, wie beispielsweise Margarine, für die menschliche Ernährung.

12. Applikation der verzweigt-kettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 9 und 10 als Einzelkomponenten oder im Gemisch als Zusatzstoffe in übrigen Lebensmitteln und Materialien zur Herstellung von Lebensmitteln.

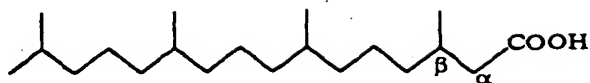
13. Applikation der verzweigt-kettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 9 und 10 als Einzelkomponenten oder im Gemisch als Zusatzstoffe in Genußmitteln und in Materialien zur Herstellung von Genußmitteln.

---

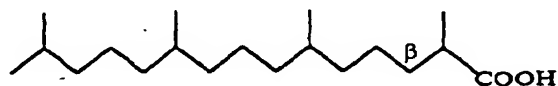
Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

---

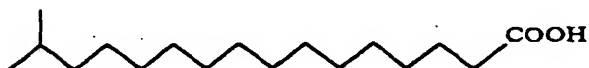
- Leerseite -



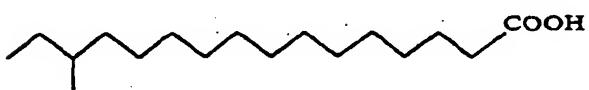
Phytansäure



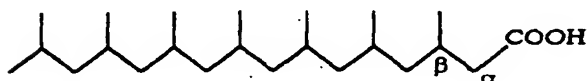
Pristansäure



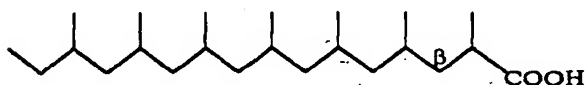
iso-Fettsäure



anteiso-Fettsäure

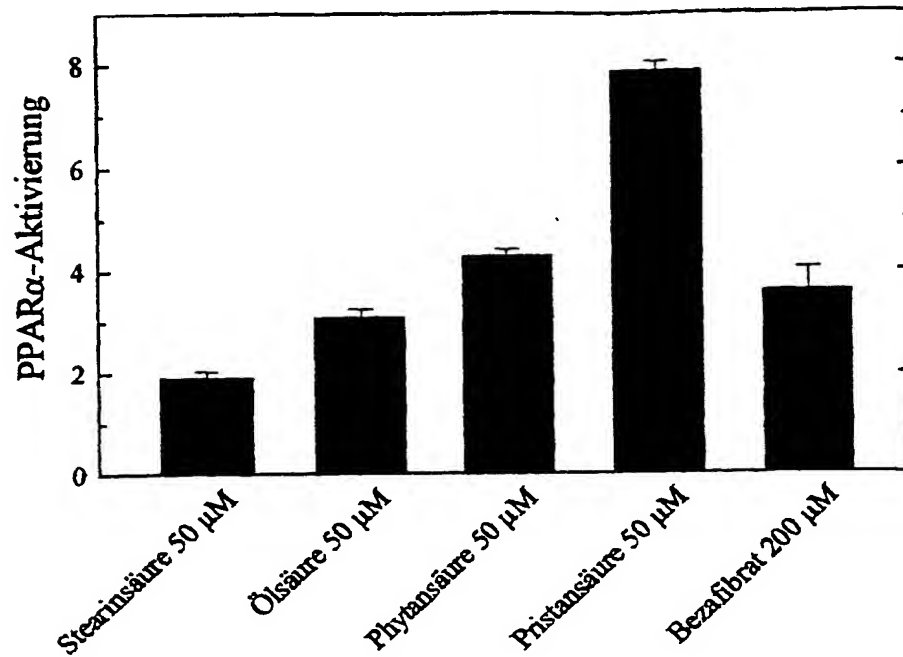


Fettsäure mit Methylverzweigungen an geradzahligen Kohlenstoffatomen

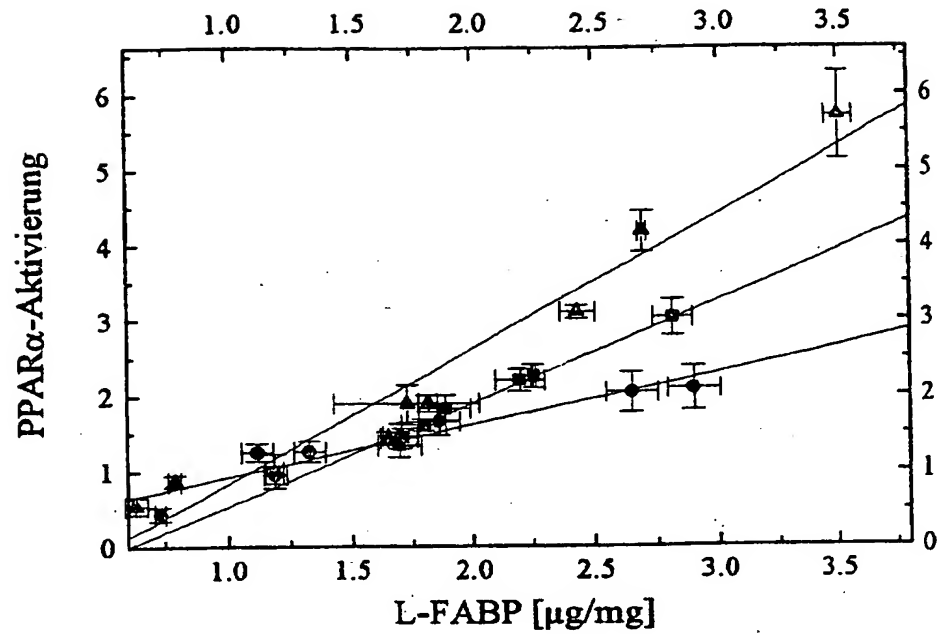


Fettsäure mit Methylverzweigungen an ungeradzahligen Kohlenstoffatomen

Abb. 1 Beispiele für verzweigtkettige Fettsäuren

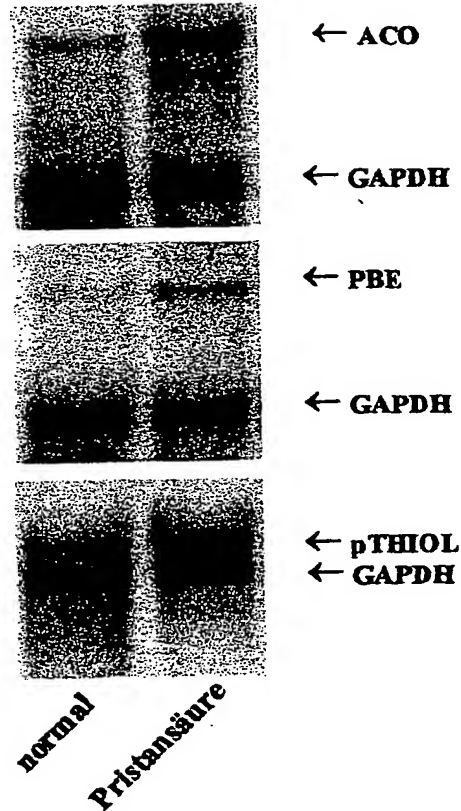


**Abb. 2** Transaktivierung von humanem PPARα in HepG2 Zellen durch Fettsäuren und Bezafibrat ( $n=6 \pm \text{SD}$ ).



**Abb. 3** Transaktivierung von humanem PPAR $\alpha$  in Abhängigkeit von L-FABP durch 200  $\mu$ M Stearinsäure (●), 50  $\mu$ M Arachidonsäure (■) und 100  $\mu$ M Phytansäure (▲) ( $n=6 \pm$  SD)

BEST AVAILABLE COPY



**Abb. 4** Transaktivierung von Enzymen des peroxisomalen Fettsäurestoffwechsels in  
Pristansäure gefütterten Mäusen ( $n=3 \pm SD$ )